

Coletânea de Métodos Analíticos para Determinação de Fibra



ISSN 1516-8247

Dezembro 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 113

Coletânea de Métodos Analíticos para Determinação de Fibra

Sidinéia Cordeiro de Freitas

Rosemar Antoniassi

Tania dos Santos Silva

Ilana Felberg

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba

CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Telefone: (21) 3622-9600

Fax: (21) 2410-1090 / 3622-9713

Home Page: www.ctaa.embrapa.br

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações e Editoração da Unidade

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas,
Ilana Felberg, Luciana Sampaio de Araújo, Marília Penteado Stephan,
Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borquini, Renata Torrezan

Supervisão editorial: Virgínia Martins da Matta

Revisão de texto: Edson Watanabe

Normalização bibliográfica: Luciana Sampaio de Araújo

Tratamento de ilustrações: Marcos Moulin e Andre Luis do Nascimento Gomes

Editoração eletrônica: Marcos Moulin, Andre Luis do Nascimento Gomes e
Chris Maciel

Ilustração da capa: Chris Maciel

1ª edição

1ª impressão (2011): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Freitas, Sidinéia Cordeiro de.

Coletânea de métodos analíticos para determinação de fibra / Sidinéia
Cordeiro de Freitas... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de
Alimentos, 2011.

35p. ; 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos,
ISSN 1516-8247 ; 113).

1. Fibra. 2. Polissacarídeo. 3. Lignina. I. Freitas, Sidinéia Cordeiro de. II.
Antoniassi, Rosemar. III. Silva, Tania dos Santos. IV. Felberg, Ilana. V. Série.

CDD 613.28 (21. ed.)

©Embrapa 2011

Autores

Sidinéia Cordeiro de Freitas

Engenheira Química, Doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sidi@ctaa.embrapa.br

Rosemar Antononiassi

Engenheira de Alimentos, Doutora em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, rosemar@ctaa.embrapa.br

Tania dos Santos Silva

Engenheira Química, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, taniass@ctaa.embrapa.br

Ilana Ferberg

Farmacêutica, Doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, ilana@ctaa.embrapa.br

Apresentação

Este documento apresenta informações abrangentes sobre a história analítica da fibra, desde o conhecimento primário, que foi a análise da fibra bruta, até os dias de hoje com o desenvolvimento do conceito fisiológico da fibra alimentar.

O interesse maior por estas fibras é devido ao fato de que elas auxiliam o funcionamento do intestino e, portanto, podem ser incluídas na categoria dos ingredientes funcionais o que, naturalmente, incentivou sua ingestão como parte de produtos alimentícios e/ou sua agregação em produtos processados.

Desta forma, torna-se de grande importância a quantificação adequada de sua presença nos alimentos. Este documento mostra a visão de vários autores sobre a definição de fibras e os métodos utilizados para sua quantificação.

Temos a pretensão de que tenha ampla utilidade entre pesquisadores, estudantes, técnicos e profissionais da área, em geral.

Regina Celi Araujo Lago
Chefe Geral
Embrapa Agroindústria de Alimentos

Sumário

| | |
|--|----|
| Introdução | 10 |
| Desenvolvimento | 13 |
| Métodos Gravimétricos | 14 |
| Método de Weende | 14 |
| Método Hennerberg | 14 |
| Método de Van Soest | 15 |
| Método de Goering e Van Soest | 15 |
| Método Enzimático-Gravimétricos | 15 |
| Método da fibra detergente neutra enzimática (FDN enzimático) | 15 |
| Método de fibra detergente ácida (FDA) | 16 |
| Método de determinação de lignina e celulose | 17 |
| Método para determinação de Pentose | 17 |
| Método de fibra alimentar total | 18 |

| | |
|--|----|
| Métodos Enzimáticos-Químicos | 22 |
| Método Uppsala | 22 |
| Método de Englyst | 25 |
| Medida colorimétrica rápida de NSP total | 26 |
| Medida do NSP solúvel e insolúvel | 26 |
| Método Southgate | 26 |
| Método de Selvendran e Du Pont | 27 |
| Método de Theander e Aman | 28 |
| Método de Theander e Westerlund | 28 |
| Método de determinação por pirólise/GLC/MS | 28 |
| Método de determinação de fibra detergente neutra e proteína por espectrofotometria de refletância no infra vermelho próximo - NIR | 29 |
| Considerações Finais | 30 |
| Referências | 30 |

Coletânea de Métodos Analíticos para Determinação de Fibra

Sidinéia Cordeiro de Freitas

Rosemar Antoniassi

Tania dos Santos Silva

Ilana Felberg

Introdução

A primeira citação histórica sobre fibra é atribuída a Hipócrates, que viveu a 500 A.C., dentre as suas recomendações, constava a ingestão de dietas com elevado conteúdo de fibra devido ao seu efeito laxativo benéfico. No final do século XIX e início XX intensificou-se o processamento de alimentos e na maioria dos processos industriais as fibras eram descartadas. Atualmente as pesquisas mostram que a fibra interfere no funcionamento do sistema digestivo, desde sua ingestão até a excreção, tornando-se um ingrediente importante na dieta.

A fibra é uma mistura de substâncias complexas e está presente na maioria das dietas consumidas diariamente pela população principalmente em vegetais, frutas, e grãos integrais e também podem ser extraídas de sementes, exsudados de plantas, algas marinhas e raízes. A definição desde os primeiros estudos é controversa, sendo em consequência definida diferentemente por vários autores.

Segundo a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003) fibra alimentar é qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano (BRASIL, 2003).

Spiller (2001) escreveu um Compêndio sobre fibra dietética na alimentação humana e citou alguns autores e termos e definições recomendados:

Trowell

A fibra da dieta consiste de substâncias vegetais não metabolizadas por enzimas digestivas humanas, incluindo tanto substâncias da parede celular de planta (celulose, hemicelulose, pectina e lignina), quanto polissacarídeos intracelulares, tais como gomas e mucilagens.

Trowell, Spiller

O mesmo que a definição anterior, incluindo outras substâncias derivadas de plantas, que são indigeríveis pelas enzimas digestivas de humanos tais como: hidrocarbonetos hidrofóbicos, hidrocarbonetos de cadeia longa e proteínas da parede celular indigeríveis. Estas são as substâncias que são normalmente associadas e concentradas em torno da parede celular da planta.

Southgate

A fibra da dieta é um somatório do teor de lignina e de polissacarídeos que não são hidrolisados pelas secreções endógenas do trato digestivo humano. Esta definição é considerada fisiológica e mostra que é necessário produzir uma definição que possa ser traduzida puramente em termos analíticos. Este autor sugere uma definição química baseada no fato de que a soma da lignina e polissacarídeos não amido é o melhor índice de fibra alimentar na dieta.

Furda

Definição química: é a soma de polissacarídeos não amido e lignina.
Definição fisiológica: alimentos provenientes de planta resistentes a hidrólise por enzimas alimentares de humanos.

Spiller

Este autor sugere a mesma definição de Trowell et al. (1976), mas evita usar o termo fibra, uma vez que muitas substâncias definidas como fibra podem não possuir natureza fibrosa. Em 1976, Spiller recomendou a troca do termo complexo de fibras alimentares, e incluiu na definição as partes indigeríveis das células de plantas, não incluindo outros compostos tais como graxas, proteínas indisponíveis e outros. Foi estabelecida a definição de que a fibra é um polímero simples de plantas, não digerível pelas enzimas digestivas do homem, mas que podem ser digeridas por micro-organismos no trato intestinal humano. Exemplo: pectinas e celulosas.

Mccance e Lawrence

Estes autores definem fibra como a presença de carboidratos indisponíveis, que é um termo clássico usado em nutrição há muitos anos, para distinguir carboidratos disponíveis e indisponíveis em humanos. Como originalmente definido, inclui a lignina, que não é um carboidrato.

Trowell e Godding

Estes autores dão uma definição expandida de fibra alimentar em relação aos conceitos descritos acima, quando são acrescentados outros grupos de polissacarídeos indigeríveis por enzimas humanas e relacionada a substâncias adicionadas, como:

- Fibras animais não digeríveis por enzimas digestivas humanas (Exemplo: aminopolissacarídeos).
- Polissacarídeos sintéticos ou parcialmente sintéticos não digeríveis por enzimas digestivas humanas (Exemplo: metilcelulose).
- Polissacarídeos que não fazem parte de alimentos tradicionais, que não são digeríveis por enzimas digestivas humanas. Exemplo: produtos farmacêuticos.

Van Soest

Van Soest (1967) define resíduo detergente neutro como o obtido depois da digestão por solução detergente neutra, essencialmente constituído de celulose, hemicelulose e lignina. Frequentemente chamada de fibra detergente neutra.

Henneberg

Henneberg (1859) diz que fibra é o resíduo remanescente da digestão ácida e alcalina de célula de plantas. O termo não deve ser usado com referência à fibra alimentar. Esta é uma definição antiga do século 19. No valor de fibra bruta estão incluídas porções variáveis de celulose, hemicelulose e lignina.

Englyst

Englyst (1981) define a fibra alimentar como polissacarídeos não amido (NSP), isto é, os carboidratos derivados de material originário das paredes celulares de planta menos a lignina, e analisa de tal forma a eliminar alguma outra substância de planta que possa aparecer em outro

método analítico. Métodos para determinar NSP não levam em conta o amido resistente que corresponde ao amido que não é digerível por enzimas digestivas humanas e alcança o cólon, frequentemente agindo da mesma forma que a fibra.

Desenvolvimento

Apesar das divergências relacionadas à sua definição, do ponto de vista químico, a fibra alimentar consiste de polissacarídeos não amido e lignina, os quais não são metabolizados pelas enzimas intestinais do homem. Estes polissacarídeos são representados por compostos quimicamente diversos como a hemicelulose, celulose, pectina, carragena, goma guar e agar, entre outros.

As propriedades físico-químicas de cada fração da fibra, assim como o grau de desintegração durante o processamento e a mastigação, influem em seus efeitos fisiológicos no organismo.

A maioria dos métodos analíticos determina as fibras alimentares levando em conta o conceito químico; poucos tentam medir o conceito fisiológico, que é basicamente a propriedade de não serem hidrolisadas por enzimas do trato digestivo.

Dados mostram que análise de algumas fontes de fibra alimentar, as quais são analisadas como frações solúveis e insolúveis, não são consistentes com o que se conhece sobre os seus efeitos fisiológicos.

Os aspectos botânico, fisiológico e químico do conceito de fibra alimentar podem ser encontrados em três princípios analíticos principais e em um número considerável de métodos analíticos.

1° - Princípio da análise das paredes celulares das plantas. Mede os componentes existentes na parede celular dos vegetais. Exemplo: Método de fibra detergente neutra (FDN) e método de fibra detergente ácida (FDA), entre outros.

2° - Princípio químico. Mede a fibra alimentar como a soma de seus constituintes. Exemplos: Métodos colorimétricos, cromatografia gás-líquido (CGL), método Englyst.

3° - Princípio enzimático – gravimétrico. Mede resíduos indigeríveis. Exemplo: Método AOAC International (AOAC INTERNATIONAL, 2010).

Considerando então os métodos disponíveis para análise de fibras, podem-se utilizar duas direções distintas:

- Avaliação da fibra alimentar total (precipitação total de fibras)
- Identificação e quantificação de todas as classes dos constituintes da amostra (separação das fibras solúveis, fibras insolúveis e carboidratos metabolizáveis).

Estas avaliações podem ser realizadas por métodos gravimétricos, enzimático-gravimétricos ou químicos (Figura 1), conforme descrito a seguir:

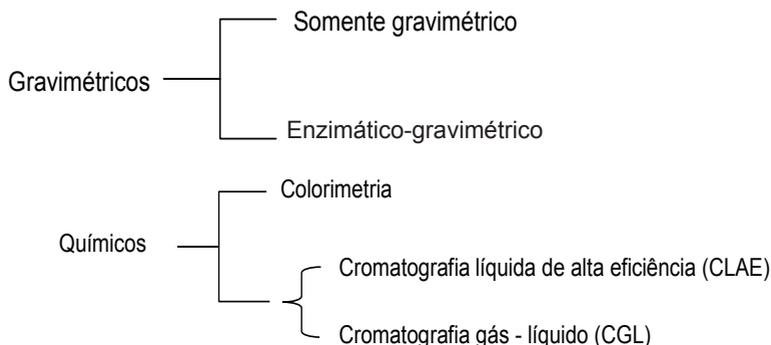


Figura 1. Classificação dos métodos de fibras.

Métodos Gravimétricos

Método de Weende (WILLIAMS; OLMSTED, 1935)

O método mais antigo de determinação de fibra bruta. Neste procedimento, há degradação de toda fibra solúvel e quantidade apreciável de fibra insolúvel. Consiste na digestão ácida e alcalina da amostra. O resíduo obtido constitui a fibra bruta, que é lavada com água quente e álcool, seca em estufa, pesada e queimada em mufla para eliminação de interferentes do resíduo mineral fixo carreado.

Método Henneberg (HENNEBERG, 1859)

Método semelhante ao anterior, com digestão ácida e alcalina, porém com filtração entre as duas etapas. Proposto pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), inclui uma etapa de extração de gordura em matrizes com teor

de gordura igual ou maior que 10%. A gordura deve ser extraída com éter.

Método de Van Soest (VAN SOEST, 1967)

Considerado o método de maior eficiência na análise de fibra insolúvel em água, é denominado método de fibra detergente neutra (FDN). Fundamenta-se na hipótese de que a fibra pode ser quantitativamente e especificamente separada dos outros componentes do alimento (proteínas, amido e lipídios) por ebulição com solução detergente em pH neutro. As fibras insolúveis (celulose, a maior parte das hemiceluloses e lignina) são separadas por filtração e as fibras solúveis em água (pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses) são perdidas durante o processamento e descartadas. A relação entre fibra insolúvel e solúvel em água depende da escolha das condições durante o processo de pré-tratamento e solubilização. Assim, a classificação das fibras de acordo com a solubilidade pode ser errônea.

Soluções detergentes utilizadas:

- Lauril sulfato de sódio
- Etoxi-etanol (cellosolv, éter mono etil glicol etileno)
- Dodecilsulfonato de sódio

Método de Goering e Van Soest (GOERING; VAN SOEST, 1970)

Este método é denominado de fibra detergente ácida (FDA), no qual a fibra é específica e quantitativamente separada por solução detergente em pH ácido.

Métodos Enzimático-Gravimétricos

Método da fibra detergente neutra enzimática (FDN enzimático)

Modificações do método proposto por Van Soest (1967) foram realizadas por Schaller (1977) e, posteriormente, por Robertson e Van Soest (1981). Introduziu-se uma etapa de digestão enzimática após a etapa de filtração. Schaller (1977) utilizou amilase de pâncreas suíno e Robertson e Van Soest (1981) usaram α -amilase de *Bacillus subtilis*.

A amostra sofre tratamento com solução detergente em pH neutro e posterior filtração. Adiciona-se α -amilase de pâncreas suíno ao precipitado. Após a digestão, faz-se a filtração, lavagem com água e acetona. O resíduo é seco em estufa a 100°C e corresponde a concentração de FDN na amostra.

O método de Schaller (1977) foi adotado pela AACC International (American Association of Cereal Chemists) em 1983. Este método foi considerado por estimar a fibra alimentar total em produtos de cereais. Porém, foi considerado inadequado para frutas, folhas e raízes. Na publicação da AACC, a enzima é adicionada junto com a solução detergente (AACC INTERNATIONAL, 2009).

Há diversas variações de procedimento no método FDN-enzimático. Há variações na enzima utilizada, bem como nas condições de tempo e temperatura de digestão.

- Jeraci et al. (1989) – Usam α -amilase termo-estável (Termamyl) e aquecimento com ebulição por 60 minutos.
- Robertson e Van Soest (1981) – Usam como primeira etapa a ação da solução detergente neutra por 30 minutos. E, logo após, digestão com α -amilase de *Bacillus subtilis*.
- Mertens (1988) – Usa como primeira etapa a ação da solução detergente neutra por 40 minutos e, após, digestão com α -amilase de *Bacillus subtilis* por 20 minutos.
- Método Mongeau-Brassard (MONGEAU; BRASSARD, 1986) – Método FDN+SOL é uma modificação do método de Goering e Van Soest (1970). Consiste na determinação de FDN e na posterior separação da fração solúvel. Para se eliminar a interferência do resíduo, o amido é gelatinizado e hidrolisado com amiloglicosidase (MONGEAU; BRASSARD; VERDIER, 1989).

A partir da determinação de FDN, é possível quantificar um grupo de componentes, que constituem a fibra detergente ácida (FDA) e, a partir desta, os seus componentes separadamente (lignina, celulose e pentose).

Método da fibra detergente ácida (FDA)

Para esta determinação, usa-se o resíduo obtido no método FDN enzimático, que é adicionado de solução detergente ácida. Após o tempo de reação de 60 minutos em ebulição, filtra-se. O resíduo deve

ser lavado com água destilada e, logo após, com acetona, seco em estufa a 100°C e pesado.

Método de determinação de lignina e celulose

• Lignina - Método do permanganato

O resíduo de detergente ácido enzimático é tratado com solução de permanganato. Depois do descarte do permanganato remanescente (por aspiração), o resíduo é tratado com solução desmineralizante e lavado com etanol e acetona. O resíduo é seco a 100°C e pesado. O valor da lignina é obtido pelo cálculo abaixo:

Resíduo de FDA – resíduo de permanganato = LIGNINA

• Celulose – Método do ácido sulfúrico

O resíduo detergente permanganato, obtido no item anterior, é tratado com H_2SO_4 a 72%, por 3 horas. Em seguida, o resíduo obtido é filtrado, lavado com água quente, secado a 100°C e pesado. O valor da celulose é obtido pelo cálculo abaixo:

Resíduo de permanganato – Resíduo de H_2SO_4 = CELULOSE

Método de determinação da pentose

A fibra detergente neutra é extraída de aproximadamente 0,5 g de amostra seca, ou de quantidade necessária para se obter 0,1 g de FDN. O resíduo de FDN é tratado com 20 mL de H_2SO_4 1M (2,5h a 100°C), que hidrolisa os polissacarídeos não celulósicos. Os açúcares hidrolisados são extraídos com etanol. O teor de pentose é determinado pelo método de Mejbaum (1939), modificado por Albaum e Umbreit (1947), que usa reação de $FeCl_3$ -HCl e solução de orcinol alcóolico com pentoses. Há formação de cor, que é lida a 600nm.

O conteúdo de hexose pode ser determinado pelo procedimento de Roe (1955). Neste método, há quantificação colorimétrica de açúcares totais, através do uso da antrona, que reage com hexoses produzindo coloração azul e com pentoses, produzindo coloração verde amarelada. A concentração de pentose é usada para corrigir a sua interferência na quantificação das hexoses. A resposta colorimétrica é comparada com uma curva padrão de glicose (100µg de glicose, que produz cor equivalente a 5µg de arabinose).

Método de fibra alimentar total

Método adotado pela AOAC International em 2005. Este método foi desenvolvido sob a liderança de Leon Prosky do FDA (Food and Drug Administration) e baseado nas experiências de Furda (1983), Asp et al. (1983), Englyst e Cummings (1984), Southgate (1992), Theander e Westerlund (1986), Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e Wursch (1991).

Amostras em duplicata de alimentos secos com mais de 10% de gordura deverão ser desengorduradas previamente. A seguir, são tratadas com Termamil (α -amilase termo estável) em tampão fosfato pH 6, a fim de hidrolisar os amidos presentes, sendo, em seguida, enzimaticamente digeridas com protease (em tampão fosfato) e amiloglucosidase para remover proteínas e amido. Nesta solução, estão contidas as fibras solúveis e as insolúveis. Para a precipitação das fibras solúveis, adicionam-se 4 volumes de etanol a 95%. O resíduo total é separado por filtração, lavado com álcool a 95%, com acetona, seco em estufa e pesado. Uma das duplicatas é analisada para se determinar o teor de proteína e, a outra, o teor de cinzas.

A fibra alimentar total corresponde ao resíduo menos o percentual de proteína e cinzas. O resíduo medido como fibra alimentar por este método consiste de NSP, algum amido retrogradado, lignina, produtos resultantes da reação de Maillard e um número de compostos não identificados de origem animal e vegetal.

No método adotado pelo AACC International (32-05.01), a determinação de fibra alimentar total segue o mesmo procedimento descrito anteriormente no método da AOAC International (2010).

Vários autores sugeriram modificações nos métodos de fibra alimentar total descritos acima.

Prosky et al. (1988) sugeriram modificação na análise, introduzindo a etapa de separação e quantificação de fibra solúvel e insolúvel. Para o cálculo da fibra total, o resíduo resultante da digestão com protease e amiloglucosidase é filtrado e o precipitado é lavado com água, seco em estufa e pesado, obtendo-se o valor de fibra insolúvel. O filtrado e a água de lavagem são tratados com álcool para precipitar os componentes solúveis. O resíduo obtido é filtrado, lavado com álcool, seco em estufa e pesado. Este corresponde então o valor de fibra solúvel. É necessário realizar a correção para proteína e cinzas de cada resíduo obtido, isto é, o resíduo de fibra solúvel (FS) e de insolúvel (FI),

sendo FS + FI = fibra total (FT).

Lee, Prosky e De Vries (1992) propuseram a mudança do tampão fosfato por tampão 0,05M MES/TRIS (0,05M MES- ácido 2-N-(morpholino) etanosulfônico; 0,05M TRIS – Tris hidroximetil aminometano). Este método (Figura 2) está descrito no AOAC International (2010) como método 991.43 e apresenta correlação com o método original.

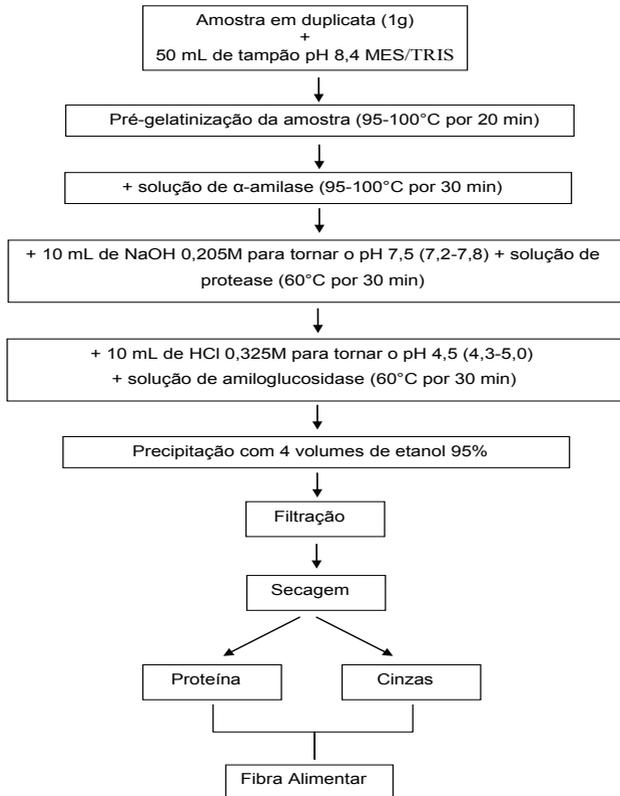


Figura 2. Fluxograma do método descrito por Lee, Prosky e De Vries (1992).

Nishimune et al. (1991) introduziram uma etapa de digestão com pepsina, a fim de diminuir os erros de eliminação de amino polissacarídeos (exemplo: quitina e ácidos quílicos, etc) que são encontrados em alimentos de origem marinha considerados como fonte de fibra.

Lahaye (1991) propôs a redução da formação de gel altamente viscoso, que impediria a recuperação de toda a fração estável de fibra solúvel, usando tampões salinos de pH 2 e pH 7.

Li e Andrews (1988) usaram somente um período de incubação e uma enzima (amiloglicosidase). Esta modificação acarreta um valor mais alto para a correção de proteína.

Al-Hasani, Hlavac e Huntsman (1993) sugerem a introdução de uma etapa de dispersão da amostras em tampão fosfato pH 7,4, para proporcionar maior reatividade das enzimas e adição de enzima de bile pancreática. Este método (Figura 3) visa submeter a amostra a condições semelhantes às encontradas no sistema digestivo humano e mostrou boa correlação com o método do AOAC.

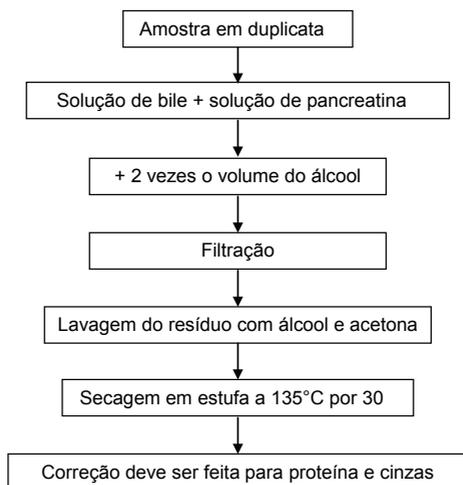


Figura 3. Fluxograma do método descrito por Al-Hasani, Hlavac e Huntsman (1993).

Fleury e Lahaye (1991) objetivaram simular as funções das fases gástrica e intestinal da digestão, utilizando a temperatura e pH do organismo humano. Este procedimento resulta em 3 frações: uma insolúvel e 2 solúveis, sob condições de pH 2 e 7,5, que, somadas, resultarão no valor de fibra alimentar total.

Li e Cardozo (1992) introduziram uma fase de solubilização da amostra em água deionizada à temperatura de 37°C, durante um período de 90 minutos, sendo, posteriormente, adicionado etanol para precipitar a fração solúvel, seguida de filtração do resíduo, lavagem e secagem. O valor obtido neste procedimento deve ser corrigido em relação ao conteúdo de proteína. O valor do resíduo menos o valor da proteína dará valor de fibra total. Este método é indicado para a determinação de fibra total em frutas e legumes.

Jeraci et al. (1989) utilizou o método denominado de ureo-enzimático (Figura 4). O autor usa o princípio de que as amilases são ativadas em solução 8M de uréia à temperatura ambiente, permitindo a gelatinização e hidrólise do amido e outros polissacarídeos solúveis, sem aquecimento extra. Portanto, uma porção da amostra é colocada em um tubo de diálise e é submetida à ação das amilases ativadas por uréia. A seguir, o amido hidrolisado é removido do tubo e adiciona-se a protease. Após a ação desta última enzima, o conteúdo do tubo de diálise é transferido para béquero, onde recebe a adição de álcool. O resíduo é filtrado e seco em estufa. Deve-se fazer a correção do resultado de fibra alimentar total para o valor de proteína e cinzas do resíduo. Este método é particular para amostras que formam gel durante a precipitação com álcool. Também pode ser empregado para se determinar fibra solúvel e insolúvel.

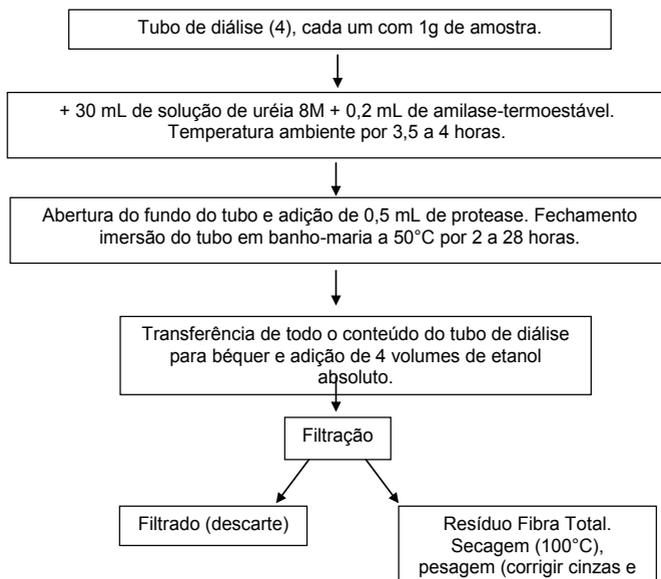


Figura 4. Fluxograma do método descrito por Jeraci et al. (1989).

Métodos Enzimático-Químicos

Consiste na separação dos componentes da fibra, por intermédio da hidrólise dos polímeros, seguida da determinação de seus resíduos por Espectrofotometria ou Cromatografia (GC ou CLAE).

Método Uppsala (THEANDER, 1989; THEANDER; WESTERLUNG, 1986)

Método de determinação de fibra alimentar total, usando a caracterização dos seus açúcares constituintes por cromatografia gasosa. O teor de fibra equivale à soma de açúcares neutros, ácidos urônicos, amido resistente e lignina.

As etapas desta determinação incluem primeiramente a remoção de açúcares livres e amido com α -amilase termo-estável, seguida de determinação dos resíduos de polissacarídeos não amidos como acetato de alditol por cromatografia gás-líquido (GLC). Lignina e frações de não carboidrato da fibra alimentar são determinadas gravimetricamente como material ácido insolúvel. Ácidos urônicos são determinados por descarboxilação e quantificação por condutimetria.

Utilizou-se uma amostra representativa seca para a trituração. No caso de umidade da amostra ser elevada, esta deverá ser previamente liofilizada e, se o teor de gordura for superior a 6%, a amostra deverá ser desengordurada com éter de petróleo.

O amido é removido por incubação com α -amilase termo-estável (Termamyl), minimizando o risco de retrogradação. Em seguida, adiciona-se amiloglucosidase. Para determinação de fibra total, é necessário precipitar as fibras solúveis em álcool a 80% (Figura 5 A).

Para determinação do valor de fibra solúvel e insolúvel separadamente (Figura 5 B), a fibra solúvel (em solução) será separada da fibra insolúvel (precipitada) por centrifugação.

A fibra Insolúvel pode ser hidrolisada para determinação da lignina usando o procedimento conhecido como "lignina de Klason", que estabelece a adição de H_2SO_4 12M a 30°C e hidrólise em H_2SO_4 18 M em autoclave a 121°C, seguida da adição de mio-inositol como padrão interno. A solução quente é filtrada através de filtro de vidro e o resíduo livre de cinzas é pesado como "lignina de Klason". Os resíduos de polissacarídeos neutros no filtrado são reduzidos e acetilados usando 1-metil-imidazol como catalisador e o acetato de alditol formado é quantificado por cromatografia gás-líquido (GLC), usando coluna capilar

DB-225. O método utiliza, também, fatores de correção para cada açúcar individual para compensar as perdas por hidrólise.

Os ácidos urônicos (galacturônicos, glicurônicos e outros) são determinados em amostra separada do material original usando o procedimento de descarboxilação. O CO_2 liberado é capturado por solução aquosa de NaOH e quantificado por condutimetria. Este método pode ser adaptado facilmente para analisar fibras solúveis e insolúveis. Neste caso, as fibras solúveis são separadas após degradação do amido e recuperadas por diálise e liofilização. Há precipitação com álcool e lavagem do resíduo com água. As fibras solúveis são hidrolisadas em meio ácido e os açúcares são determinados por cromatografia de alta resolução (CLAE).

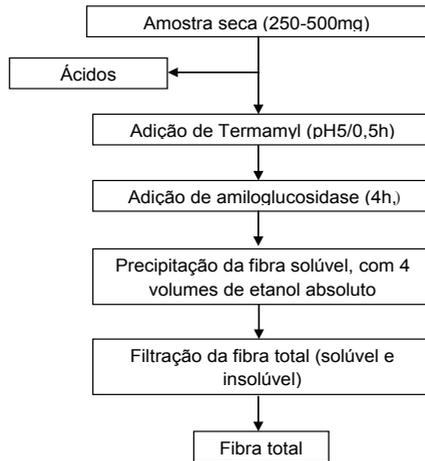


Figura 5. (A) Fluxograma do método Uppsala para determinação de fibra total.

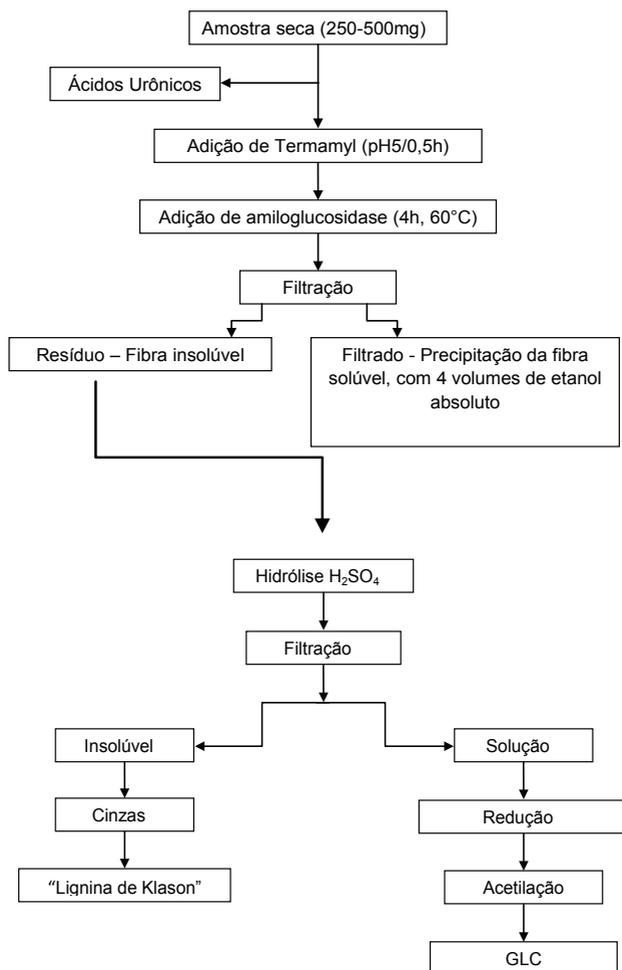


Figura 5. (B) Fluxograma do método Uppsala para determinação do valor de fibra solúvel e insolúvel separadamente.

Método de Englyst (ENGLYST; CUMMINGS, 1984).

Com a finalidade da rotulagem de alimentos, Englyst e Cummings (1984) propuseram que a fibra alimentar fosse definida como sendo polissacarídeos não amido (NSP) do trato digestivo de humanos. Métodos de análise foram paralelamente desenvolvidos para medir especificamente NSP.

Com este método, podem-se obter valores de NSP total, solúvel e insolúvel, assim como o conteúdo de celulose, ácidos urônicos e açúcares neutros, proporcionando informação sobre a composição química da fibra. Não se quantifica: amido resistente, lignina e compostos resultantes da reação de Maillard.

Neste procedimento, a amostra é tratada com dimetil sulfoxido em banho-maria em ebulição por 30 minutos, seguida de hidrólise do amido por incubação com enzimas pancreatina e pullulanase. O resíduo livre de amido é precipitado com etanol, hidrolisado com H_2SO_4 12M durante 1 hora a $100^\circ C$. Os açúcares resultantes da hidrólise são medidos como acetato de alditol por GLC. Ácidos urônicos são medidos por método colorimétrico. Os polissacarídeos não amido totais são calculados como a soma de açúcares simples e ácidos urônicos.

Para a determinação dos polissacarídeos não amido solúveis, é necessário a separação da fibra insolúvel por filtração logo após o tratamento com as enzimas. A fibra solúvel (contida no filtrado) é então precipitada com álcool. Desta forma, se obtém dois precipitados que serão hidrolisados separadamente: os polissacarídeos solúveis e os insolúveis, os quais serão calculados como a soma de seus açúcares simples.

Para a separação de NSP total dos polissacarídeos celulósicos e não celulósicos, emprega-se a reação de hidrólise usando H_2SO_4 2M durante 1 hora a $100^\circ C$. Somente os polissacarídeos não celulose serão hidrolisados. O valor da celulose é calculado como a diferença entre a glicose contida no NSP total e no polissacarídeo não celulósico

O conteúdo de açúcares neutros é determinado por colorimetria (ENGLYST; HUDSON, 1987; ENGLYST et al., 1992), cromatografia líquida de alta resolução (QUIGLEY; ENGLYST, 1992) ou por cromatografia gasosa com derivação e acetilação de açúcares (ENGLYST; CUMMINGS, 1984; ENGLYST et al., 1992) e, o conteúdo de ácidos urônicos, pela técnica colorimétrica de Scott (1979).

Método colorimétrico rápido de NSP total (ENGLYST; CUMMINGS, 1984; ENGLYST et al., 1992).

O procedimento é o mesmo descrito anteriormente, até a etapa da hidrólise com H_2SO_4 e incubação por 1 hora a $100^\circ C$. O hidrolisado é neutralizado com NaOH, adiciona-se o reagente dinitrosalicilato e a mistura é aquecida por 15 minutos a $100^\circ C$. A leitura da absorvância da amostra e dos padrões é realizada a 530 nm. O valor do NSP total é obtido diretamente como açúcar reduzido medido no hidrolisado. Se desejável, os valores de glicose e ácidos urônicos podem ser obtidos separadamente.

Método do NSP solúvel e insolúvel (ENGLYST; CUMMINGS, 1984; ENGLYST et al., 1992).

O método usa como primeira etapa a extração do NSP solúvel com tampão fosfato pH 7, por 1 hora a $100^\circ C$, seguido de sua separação por filtração. Desta forma, a medida do NSP solúvel e insolúvel é realizada de modo idêntico a determinação de NSP total, isto é, o filtrado e o resíduo de filtração são submetidos separadamente a hidrólise ácida para que sejam obtidos os açúcares constituintes das 2 fases. Os açúcares obtidos podem ser quantificados por GLC ou por calorimetria.

Método Southgate (1969, 1981)

Este método sugere a medida de fibra alimentar como a soma de seus componentes: celulose, lignina e polissacarídeos não celulósicos (PNC), os quais são fracionados em hexoses, pentoses e ácidos urônicos (Figura 6).

Nesta técnica, é realizada uma gelatinização e hidrólise do amido com amiloglucosidase, seguida de precipitação alcoólica das fibras solúveis e filtração do material insolúvel. O resíduo insolúvel corresponde à fibra total, isto é, fibra solúvel e insolúvel, enquanto que, no filtrado, encontram-se os açúcares simples e produtos de degradação do amido. O filtrado é submetido à hidrólise ácida para se obter valores destes constituintes (não fibra) medidos como pentoses, hexoses e ácidos urônicos. O resíduo da determinação da fibra total é submetido à extração com H_2SO_4 12M, quantificando-se a celulose como glicose. Todos os açúcares são medidos colorimetricamente, sendo o resíduo insolúvel pesado e considerado como lignina.

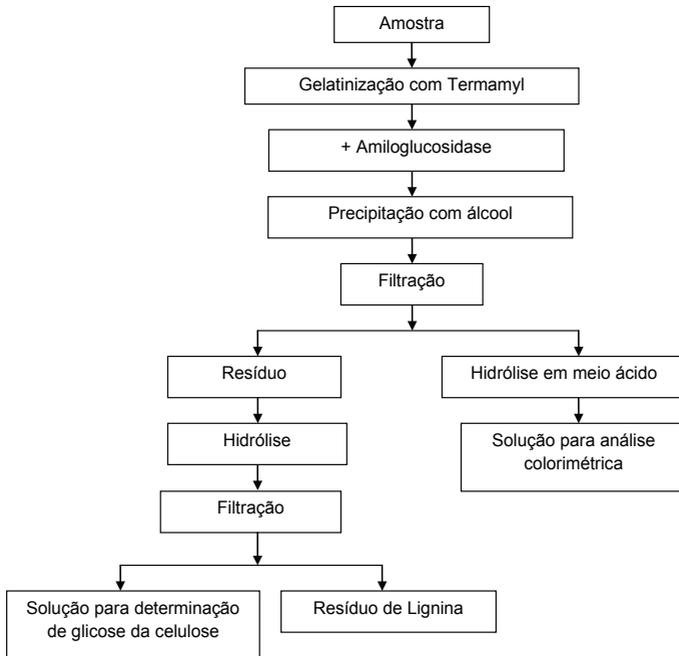


Figura 6. Fluxograma do método Southgate (1969, 1981).

Método de Selvendran e Du Pont (1980)

Neste método, a análise de fibra alimentar é realizada em 4 etapas:

1ª - Destruição da estrutura celular mediante moagem da amostra em etanol 85 % v/v, o que facilita a degradação do amido.

2ª - Eliminação do amido mediante tratamento enzimático.

3ª - Uso de procedimentos hidrolíticos com H_2SO_4 para se estimar os polissacarídeos celulósicos da fibra, sendo os açúcares redutores resultantes, como acetatos de alditol, determinados por GLC.

4ª - Determinação do conteúdo de ácidos urônicos e lignina mediante modificações do método de carbazol (BITTER; MUIR, 1962) e a "lignina de Klason" (THEANDER; WESTERLUNG, 1986), respectivamente.

Método de Theander e Aman (1982)

A fibra alimentar, para estes autores, é definida como polissacarídeos não amido e lignina. A determinação da fibra consiste na degradação do amido com a enzima altamente específica α -amilase (Termamyl) a 85°C. A fibra solúvel é extraída junto com os carboidratos de baixo peso molecular e amido hidrolisado e isolados por diálise. A composição do resíduo de açúcares neutros é determinada por GLC, após hidrólise ácida como acetato de alditol. Fatores de correção para perdas por hidrólise, produtos de derivação e resposta do GLC para açúcares individuais são incluídas neste método. O resíduo de ácidos urônicos é quantificado pelo método de descarboxilação.

No resíduo insolúvel, a lignina é determinada gravimetricamente como lignina de Klason, após a hidrólise dos polissacarídeos com H_2SO_4 18M. A quantidade dos resíduos de açúcar e de ácido urônico (calculados como polissacarídeos), na fração solúvel em água, somados à fração de lignina de Klason, na fração insolúvel em água, constituem, respectivamente, a medida do conteúdo da fibra alimentar solúvel e insolúvel.

Método de Theander e Westerlund (1986)

O método consiste em três procedimentos:

Procedimento 1: Realiza-se a hidrólise do amido presente por tratamento da amostra com α -amilase e amiloglicosidase.

Procedimento 2: A amostra, depois do tratamento enzimático, é precipitada com etanol, centrifugada e filtrada, obtendo-se no filtrado os açúcares resultantes da hidrólise do amido e, como resíduo, as fibras solúveis e insolúveis.

Procedimento 3: Os ácidos urônicos são determinados por descarboxilação e, o amido, como glicose pelo método glicose-oxidase. O valor de fibra total corresponde ao valor do resíduo obtido no procedimento 2, depois de seco e pesado.

Método de determinação por pirólise/GLC/MS (GALLETTI et al., 1993)

Este método é indicado somente para análise de "lignina de Klason", após a mesma ter sido obtida por um dos métodos anteriormente descritos.

Sua análise é difícil, pois se trata de um polímero de química complexa e que possui associação com outros componentes da parede celular. Possui estrutura altamente polar e não é volátil.

O procedimento de degradação da lignina por pirólise, acoplada com

GC e MS, resulta num sistema integrado de degradação e análise de macromoléculas.

Pirólise significa degradação pelo calor em presença de atmosfera inerte. Ocorre fissão térmica da amostra, em fragmentos de massa menor, baixa o suficiente para ser determinada por Cromatografia Gasosa ou Espectrometria de Massa e grande o suficiente para fornecer informações analíticas sobre a amostra original. Esta técnica permite que se obtenha a impressão digital da amostra em análise. A amostra é submetida a temperaturas de 600-800°C em poucos segundos. O pirograma obtido mostra os fragmentos detectados.

Método de determinação de fibra detergente neutra e proteína por espectrofotometria de refletância no infra vermelho próximo – NIR (BARTON; WINDHAM, 1988).

Para utilização desta técnica, alguns cuidados devem ser tomados inicialmente, tais como:

- A amostra deve ser representativa da usada na calibração.
- O laboratório deve possuir exatidão nos resultados obtidos.
- O processamento de dados é altamente específico.

A amostra preparada é colocada dentro do amostrador do NIR. O instrumento é parte de um sistema que foi calibrado, usando amostras representativas da população a ser testada. As respostas são convertidas em logaritmo (usualmente $\log_{10} 1/R$), por comparação da transmitância ou reflectância de uma amostra padrão. Esses resultados são finalmente coletados como valores de $\log_{10} 1/R$, estocados e processados usando modelos matemáticos estatísticos em programas computacionais específicos.

A calibração do NIR deve ser realizada com no mínimo 50 amostras de composição conhecida, cujos resultados foram obtidos e determinados por um procedimento químico padrão.

Considerações Finais

Esta coletânea tem por objetivo mostrar que a busca do conhecimento sobre fibras teve início no século passado com o conceito de fibra bruta, ocorrendo uma evolução deste conceito, apesar das diferentes definições, resultando atualmente em uma gama de métodos sensíveis e exatos, com maior ou menor grau de complexidade, que permitem analisar e quantificar fibra alimentar e seus componentes nos alimentos.

Referências

AACC INTERNATIONAL. **Approved Methods of Analysis**. 11th ed. Disponível em: <<http://methods.aaccnet.org/toc.aspx>>. Acesso em: 23 dez. 2009.

ALBAUM, H. G.; UMBREIT, U. W. Differentiation between ribose-3-phosphate and ribose-5-phosphate by means of the orcinol-pentose reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 369-376, 1947.

AL-HASANI, S.; HLAVAC, S. M.; HUNTSMAN, M. A. Simple method for determination of dietary fiber in frozen foods. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 5, p. 1014-1016, 1993.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 18th ed., 3rd rev. Gaithersburg, MD, 2010.

ASP, N.G.; JOHANSSON, C. G.; HALLMER, H.; SILJESTROM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 476-482, 1983.

BARTON, F. E.; WINDHAM, W. R. Determination of acid-detergent fiber and crude protein in forages by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 6, p. 1162-1167, Nov./Dec. 1988.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 4, n. 4, p. 330-334, 1962.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 DE DEZEMBRO DE 2003. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm >. Acesso em 23.03.2012.

ENGLYST, H. Determination of carbohydrate and its composition in plant materials. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fibers in food**. New York: M. Dekker, 1981. p. 291.

ENGLYST, H. N.; CUMMINGS, J. H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v. 109, n. 7, p. 937-942, 1984.

ENGLYST, H. N.; HUDSON, G. J. Calorimetric method for routine measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides: a comparison with gas-liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 63-76, 1987.

ENGLYST, H. N.; QUIGLEY, M. E.; HUDSON, G. J.; CUMMINGS, H. Determination of dietary fiber as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Analyst**, v. 117, n. 11, p. 1707-1714, 1992.

FLEURY, N.; LAHAYE, M. Chemical and physico-chemical characterization of fibres from *Laminaria digitata* (kombu breton): a physiological approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55, n. 3, p. 389-400, 1991.

FURDA, I. Aminopolysaccharides: their potential as dietary fiber. In: _____. **Unconventional sources of dietary fiber**. Washington, DC: American Chemical Society, 1983. (ACS Symposium Series, v. 214). cap. 8, p. 105-122.

GALLETTI, G. C.; MINCIONE, B.; MELLON, F. A.; WALDRON, K. W. Application of pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry to the analysis of kiwi mucilage. **Italian Journal of Food Science**, v. 5, n. 4, p. 379-386, 1993.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, DC: USDA, 1970. (Agriculture handbook, n. 379).

HENNEBERG, W. Ueber den heuwert der futterstoffe. **Bundesamt für Landwirtschaft**, v. 7, n. 3, p. 299, 1859.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 2008. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7>. Acesso em: 7 jan. 2010.

JERACI, J. L.; LEWIS, B. A.; VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Urea enzymatic dialysis procedure for determination of total dietary fibre. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 4, p. 677-681, 1989.

LAHAYE, M. Marine algae as sources of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some "sea vegetables". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, n. 4, p. 587-594, 1991.

LEE, S. C; PROSKY, L.; DE VRIES, J. W. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods — Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 395-416, 1992.

LI, B. W.; ANDREWS, K. W. Simplified method for determination of total dietary fiber in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 1063-1064, 1988.

LI, B.; CARDOZO, M. S. Nonenzymatic-gravimetric determination of total dietary fibre in fruits and vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 75, n. 2, p. 372-374, 1992.

MEJBAUM, W. Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsaure. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 258, n. 2-3, p. 258-260, 1939.

MERTENS, D. R. Balancing carbohydrates in dairy rations. In: LARGE HERD DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE, 1988, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1988. p. 150-161.

MONGEAU, R.; BRASSARD, R. A rapid method for the determination of soluble and insoluble dietary fiber: comparison with AOAC total dietary fiber procedure and Englyst's method. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 5, p. 1333-1336, 1986.

MONGEAU, R.; BRASSARD, R.; VERDIER, P. Measurement of dietary fiber in a total diet study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, n. 2, p. 317-326, 1989.

NISHIMUNE, T.; SUMIMOTO, T.; YAKUSIJI, T.; KUNITA, N.; ICHIKAWA, T.; DOGUCHI, M.; NAKAHARA, S. Determination of total dietary fiber in Japanese foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 74, n. 2, p. 350, 1991.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; DEVRIES, J. M.; FURDA, I. Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 1017-1023, 1988.

QUIGLEY, M. E.; ENGLYST, H. N. Determination of neutral sugar and hexosamines by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. **Analyst**, v. 117, n. 11, p. 1715-1718, 1992.

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: M. Dekker, 1981. p. 123-158.

ROE, J. H. The determination of sugar in blood and spinal with anthrona reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 212, n. 1, p. 335-343, 1955.
SCHALLER, D. R. Analysis of dietary fiber. **Food Product Development**, v. 11, n. 9, p. 70, 1977.

SCHWEIZER, T. F.; EDWARDS, C. A. **Dietary fibre: a component of food; nutritional function in health and disease**. London: Springer-Verlag, 1992. 354 p.

SCOTT, R. W. Colorimetric determination of hexuronic acid in plants materials, **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 936-941, 1979.

SELVENDRAN, R. R.; DU PONT, M. S. Simplified methods for the preparation and analysis of dietary fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 31, n. 11, p. 1173-1182, 1980.

SOUTHGATE, D. A. T. Analysis of dietary fibre: translating concepts into practice. **Nutrition & Food Science**, v. 92, n. 1, p. 15-18, 1992.

_____. Determination of carbohydrates in foods. II. Unavailable carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 20, n. 6, p. 331, 1969.

_____. Use of the Southgate method for unavailable carbohydrates in the measurement of dietary fiber. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: M. Dekker, 1981. p. 1-19.

SPILLER, G. A. Definitions of dietary fiber. In: SPILLER, G. A. (Ed.). **CRC handbook of dietary fiber in human nutrition**. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001. cap. 2.1, p. 9-10.

THEANDER, O. Plant cell walls – their chemical properties and rumen degradation. In: NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I. (Ed.). **The role of protozoa and fungi in ruminant digestion**. Armidale, AV: Penambul Books, 1989. p. 1-11.

THEANDER, O.; AMAN, P. Studies in dietary fiber: a method for the analysis and chemical characterization of total dietary fiber. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 4, p. 340, 1982.

THEANDER, O; WESTERLUND, E. Effects of individual components of dietary fiber. In: SPILLER, G. A. (Ed.). **Handbook of dietary fiber in human nutrition**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986. p. 57-75.

TROWELL, H. C.; SOUTHGATE, D. A. T.; WOLEVER, T. M.S.; LEEDS, A. R.; GASSULL, M. A.; JENKINS, D. J. A. Dietary fibre redefined. **Lancet**, v. 307, n. 7966, p. 967, 1976.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feeds analysis and its applications to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WILLIAMS, R. D.; OLMSTED, W. H. A biochemical method for determining indigestible residue (crude fiber) in feces: lignin, cellulose, and non-water-soluble hemicelluloses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 653-666, Mar. 1935. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/108/3/653.full.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2011.

WURSCH, P. Dietary fiber and unabsorbed carbohydrates. **Nestle Nutrition Workshop Series**, v. 25, p. 153-168, 1991.



Agroindústria de Alimentos

CGPE 9913



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

